

F7



PCT ORGANIZACION MUNDIAL DE LA PROPIEDAD INTELECTUAL
Oficina Internacional
**SOLICITUD INTERNACIONAL PUBLICADA EN VIRTUD DEL TRATADO DE COOPERACION
EN MATERIA DE PATENTES (PCT)**

<p>(51) Clasificación Internacional de Patentes ⁷ : C07K 14/47, A61K 38/17</p>	<p>A1</p>	<p>(11) Número de publicación internacional: WO 00/64932</p> <p>(43) Fecha de publicación internacional: 2 de Noviembre de 2000 (02.11.00)</p>
<div style="display: flex; justify-content: space-between;"> <div style="width: 45%;"> <p>(21) Solicitud internacional: PCT/ES00/00058</p> <p>(22) Fecha de la presentación internacional: 18 de Febrero de 2000 (18.02.00)</p> <p>(30) Datos relativos a la prioridad: P 9900844 23 de Abril de 1999 (23.04.99) ES</p> <p>(71) Solicitante (para todos los Estados designados salvo US): LIPOTEC, S.A. [ES/ES]; Santa Eulalia, 240, Edif. Vanduard, E-08902 Hospitalet de Llobregat (ES).</p> </div> <div style="width: 50%;"> <p>(72) Inventores; e (75) Inventores/solicitantes (sólo US): BLANES MIRA, M^a Clara [ES/ES]; Santa Eulalia, 240, Edif. Vanduard, E-08902 Hospitalet de Llobregat (ES). LLOBREGAT HERNANDEZ, M^a Mercedes [ES/ES]; Santa Eulalia, 240, Edif. Vanduard, E-08902 Hospitalet de Llobregat (ES). GIL TEBAR, Ana Isabel [ES/ES]; Santa Eulalia, 240, Edif. Vanduard, E-08902 Hospitalet de Llobregat (ES). FERNANDEZ BALLESTER, Gregorio Joaquín [ES/ES]; Santa Eulalia, 240, Edif. Vanduard, E-08902 Hospitalet de Llobregat (ES). PLANELL CASES, Rosa M^a [ES/ES]; Santa Eulalia, 240, Edif. Vanduard, E-08902 Hospitalet de Llobregat (ES). FERRER MONTIEL, Antonio Vicente [ES/ES]; Santa Eulalia, 240, Edif. Vanduard, E-08902 Hospitalet de Llobregat (ES). VINIEGRA BOVER, Salvador [ES/ES]; Santa Eulalia, 240, Edif. Vanduard, E-08902 Hospitalet de Llobregat (ES). GUTIERREZ PEREZ, Luis Miguel [ES/ES]; Santa Eulalia, 240, Edif. Vanduard, E-08902 Hospitalet de Llobregat (ES). CARBONELL CASTELL, Teresa [ES/ES]; Santa Eulalia, 240, Edif. Vanduard, E-08902 Hospitalet de Llobregat (ES). PEREZ PAYA, Enrique [ES/ES]; Santa Eulalia, 240, Edif. Vanduard, E-08902 Hospitalet de Llobregat (ES).</p> <p>(74) Mandatario: FERNANDEZ PRIETO, Angel; Columela, 5-5^o, E-28001 Madrid (ES).</p> <p>(81) Estados designados: AE, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, CA, CH, CN, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW, Patente ARIPO (GH, GM, KE, LS, MW, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), Patente euroasiática (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), Patente europea (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), Patente OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).</p> <p>Publicada <i>Con informe de búsqueda internacional.</i></p> </div> </div>		
<p>(54) Title: NEURONAL EXOCYTOSIS INHIBITING PEPTIDES AND COSMETIC AND PHARMACEUTICAL COMPOSITIONS CONTAINING SAID PEPTIDES</p> <p>(54) Título: PEPTIDOS INHIBIDORES DE LA EXOCITOSIS NEURONAL, COMPOSICIONES COSMETICAS Y FARMACEUTICAS QUE LOS CONTIENEN</p> <p>(57) Abstract</p> <p>The peptide has a sequence of 3 to 30 adjacent aminoacids from the amino end of protein SNAP-25 and is useful as neuronal exocytosis inhibitor. The cosmetic and pharmaceutical compositions contain said peptide and optionally one or more peptides from the carboxyl end of SNAP-25. Said compositions are suitable for the treatment of facial wrinkles and asymmetry and pathological neuronal exocytosis-mediated pathological disorders and alterations.</p> <p>(57) Resumen</p> <p>El péptido tiene una secuencia de 3 a 30 aminoácidos contiguos procedentes del extremo amino de la proteína SNAP-25 y es útil como inhibidor de la exocitosis neuronal. Las composiciones cosméticas y farmacéuticas comprende dicho péptido, opcionalmente junto con uno o más péptidos procedentes del extremo carboxilo de la SNAP-25. Las composiciones son adecuadas para el tratamiento de las arrugas faciales, de la asimetría facial y de trastornos y alteraciones patológicas mediadas por una exocitosis neuronal patológica.</p>		

UNICAMENTE PARA INFORMACION

Códigos utilizados para identificar a los Estados parte en el PCT en las páginas de portada de los folletos en los cuales se publican las solicitudes internacionales en el marco del PCT.

AL	Albania	ES	España	LS	Lesotho	SI	Eslovenia
AM	Armenia	FI	Finlandia	LT	Lituania	SK	Eslovaquia
AT	Austria	FR	Francia	LU	Luxemburgo	SN	Senegal
AU	Australia	GA	Gabón	LV	Letonia	SZ	Swazilandia
AZ	Azerbaiyán	GB	Reino Unido	MC	Mónaco	TD	Chad
BA	Bosnia y Herzegovina	GE	Georgia	MD	República de Moldova	TG	Togo
BB	Barbados	GH	Ghana	MG	Madagascar	TJ	Tayikistán
BE	Bélgica	GN	Guinea	MK	Ex República Yugoslava de	TM	Turkmenistán
BF	Burkina Faso	GR	Grecia		Macedonia	TR	Turquía
BG	Bulgaria	HU	Hungría	ML	Mali	TT	Trinidad y Tabago
BJ	Benin	IE	Irlanda	MN	Mongolia	UA	Ucrania
BR	Brasil	IL	Israel	MR	Mauritania	UG	Uganda
BY	Belarús	IS	Islandia	MW	Malawi	US	Estados Unidos de América
CA	Canadá	IT	Italia	MX	México	UZ	Uzbekistán
CF	República Centroafricana	JP	Japón	NE	Níger	VN	Viet Nam
CG	Congo	KE	Kenya	NL	Países Bajos	YU	Yugoslavia
CH	Suiza	KG	Kirguistán	NO	Noruega	ZW	Zimbabwe
CI	Côte d'Ivoire	KP	República Popular	NZ	Nueva Zelandia		
CM	Camerún		Democrática de Corea	PL	Polonia		
CN	China	KR	República de Corea	PT	Portugal		
CU	Cuba	KZ	Kazakstán	RO	Rumania		
CZ	República Checa	LC	Santa Lucía	RU	Federación de Rusia		
DE	Alemania	LI	Liechtenstein	SD	Sudán		
DK	Dinamarca	LK	Sri Lanka	SE	Suecia		
EE	Estonia	LR	Liberia	SG	Singapur		

PÉPTIDOS INHIBIDORES DE LA EXOCITOSIS NEURONAL, COMPOSICIONES COSMÉTICAS Y FARMACÉUTICAS QUE LOS CONTIENEN

CAMPO DE LA INVENCION

5 Esta invención se refiere a péptidos derivados del extremo amino de la proteína SNAP-25, útiles como inhibidores de la exocitosis neuronal, y a su empleo en aplicaciones cosméticas y/o terapéuticas, opcionalmente junto con un péptido derivado del extremo carboxilo de la proteína SNAP-25.

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

10 La base o mecanismo de formación de las arrugas faciales es una tensión de los músculos de la epidermis que arrastran la piel hacia el interior. Esta tensión muscular es el resultado de una hiperactividad de los nervios que inervan los músculos faciales. La hiperactividad nerviosa se caracteriza por una liberación incontrolada y excesiva de neurotransmisores que excitan las fibras musculares. Por ello, las moléculas que controlan la exocitosis neuronal contribuyen a relajar la tensión muscular y, consecuentemente, a eliminar las arrugas.

20 Las toxinas botulínicas son una familia de neurotoxinas bacterianas producidas por *Clostridium botulinum* (1) [véase el apartado relativo a la BIBLIOGRAFÍA]. Se conocen 7 serotipos diferentes (serotipos A, B, C, D, E, F y G) con un peso molecular medio de 150 kDa. Estas toxinas inhiben la exocitosis de acetil-colina en la unión neuromuscular (sinapsis neurona-músculo) de músculo esquelético (1).

30 A nivel molecular, las toxinas botulínicas son proteasas que degradan proteínas neuronales que están involucradas en el mecanismo de exocitosis activada por el ión calcio (1-3). Por ejemplo, la toxina botulínica A, la más comúnmente utilizada en clínica y cosmética [por sus aplicaciones en la

eliminación de las arrugas faciales y de la asimetría facial, y para suavizar la sintomatología de enfermedades espasmódicas], trunca la proteína neuronal SNAP-25. Esta proteína (SNAP-25) juega un papel clave en la neurosecreción
5 puesto que está involucrada en la formación de un complejo proteico (conocido con el nombre de complejo SNARE o de fusión) que dirige y controla la liberación de la acetilcolina acumulada en vesículas. El núcleo de dicho complejo de fusión lo constituyen las proteínas SNAP-25 y syntaxina, localizadas
10 en la membrana plasmática presináptica, y la proteína sinaptobrevina (o VAMP), localizada en la membrana plasmática vesicular (4,5). La función principal del complejo de fusión es aproximar y poner en contacto la vesícula cargada de neurotransmisor (acetilcolina) con la membrana plasmática
15 presináptica (4,5). De esta forma, en respuesta a una elevación de la concentración de calcio, se favorecerá la fusión de ambas membranas plasmáticas, produciendo así la liberación del neuro-transmisor. Por tanto, dicho complejo proteico SNARE de atraque y fusión vesicular constituye una
20 diana clave para controlar la neurosecreción. El truncamiento de cualquiera de las proteínas que forman el complejo de fusión previene su ensamblaje y, por tanto, inhibe la liberación vesicular y exocitosis neuronal.

La potencia de las toxinas botulínicas y, en particular,
25 el serotipo A (BOTOX®) inhibiendo la neurosecreción, así como su selectividad neuronal (sólo actúan en neuronas) está siendo ampliamente explotada terapéuticamente para corregir dolencias espasmódicas tales como las distonías, estrabismo, tics, blefarospasmo, tortícolis, etc. (6-13). La toxina botulínica
30 A (botulina A) es, además, un agente eficaz en la eliminación de las arrugas faciales y de la asimetría facial. De hecho, la administración de BOTOX® es la primera terapia eficaz que no requiere intervención quirúrgica para eliminar los signos

del envejecimiento (6,7).

El tratamiento terapéutico y cosmético con BOTOX® consiste en la inyección localizada de preparados farmacéuticos (complejo botulina A-hematoglutina, 500 kDa) diluidos en las zonas donde se localiza la tensión muscular. Los efectos paralíticos de la toxina son reversibles con una media de duración de 6 meses (6,7). El tratamiento, por tanto, requiere la inyección repetida de BOTOX®. El problema principal de este tratamiento es la posibilidad de que se desencadene una reacción inmune contra el preparado farmacéutico debido a que por su tamaño molecular puede ser objeto de reconocimiento por el sistema inmunitario del paciente. La aparición de anticuerpos contra la botulina A constituye un grave problema ya que contribuye a una clara pérdida de eficacia del tratamiento (6-13). Esta pérdida de eficacia del tratamiento con BOTOX® conlleva la necesidad de aumentar la concentración del preparado en tratamientos posteriores, lo que a su vez produce una potenciación de la respuesta inmune. Como alternativa se ha barajado el uso de serotipos distintos de toxinas botulínicas (BoTox), tales como BoTox B, BoTox F y BoTox E. No obstante, la aplicación de preparados farmacéuticos con serotipos distintos no puede considerarse una solución al problema puesto que, tarde o temprano, la reacción inmune se puede volver a producir. Además, el tratamiento con toxinas botulínicas es caro debido, principalmente, a la labilidad e inestabilidad de las preparaciones farmacéuticas que las contienen.

Existe, por tanto, una necesidad imperiosa de desarrollar moléculas que imiten los efectos paralíticos de las toxinas botulínicas pero que estén dotadas de estructuras moleculares mucho más sencillas y estables, que no induzcan reacciones inmunes, y cuyo coste de producción sea económico. Las moléculas de naturaleza peptídica cumplen estas propiedades.

Se han descrito secuencias aminoacídicas que inhiben la exocitosis neuronal. En concreto, se ha demostrado que péptidos con un número de aminoácidos superior a 20, derivados de la secuencia C-terminal de SNAP-25, bloquean la liberación de catecolaminas de células cromafines permeabilizadas (14). Del mismo modo, se han descrito péptidos derivados de las secuencias aminoacídicas de las proteínas syntaxina y VAMP que también pueden afectar al proceso exocitótico (15). Aunque estos péptidos muestran actividad biológica, no se ha producido su desarrollo ulterior como agentes cosméticos y/o terapéuticos debido, probablemente, a su tamaño ya que dificultan y encarecen su desarrollo como agentes terapéuticos útiles. Por tanto, existe la necesidad de encontrar moléculas de tamaño inferior que puedan aplicarse en cosmética y medicina.

Esta invención proporciona una solución a las necesidades existentes que comprende el descubrimiento de unas secuencias aminoacídicas más pequeñas, entre 3 y 30 aminoácidos, derivadas del extremo amino (dominio N-terminal) de la proteína SNAP-25, que inhiben la exocitosis neuronal. Además, se ha descubierto que el uso simultáneo de péptidos derivados del extremo amino y del extremo carboxilo (dominio C-terminal) de SNAP-25 produce un aumento considerable de su actividad inhibitoria, es decir, existe una potenciación de su actividad frente a la mostrada por los péptidos individuales.

Por tanto, un objeto de esta invención lo constituye un péptido que tiene una secuencia constituida por 3 a 30 aminoácidos contiguos contenidos en el extremo amino de la proteína SNAP-25, que inhibe la exocitosis neuronal.

Un objeto adicional de esta invención lo constituye un ácido nucleico que esencialmente codifica un péptido de los proporcionados por esta invención. Los plásmidos y vectores que contienen dicho ácido nucleico (también identificados como

construcciones), así como las células transformadas con dichos plásmidos o vectores que expresan un péptido de la invención también constituyen objetos adicionales de la presente invención.

5 Otro objeto adicional de esta invención lo constituye una mezcla de, al menos, un péptido de los proporcionados por esta invención y, al menos, un péptido que tiene una secuencia constituida por 3 a 30 aminoácidos contiguos contenidos en el extremo carboxilo de la proteína SNAP-25.

10 Otro objeto adicional de esta invención lo constituye una composición cosmética que comprende, al menos, un péptido de los proporcionados por esta invención. El empleo de los péptidos proporcionados por esta invención en la elaboración de dicha composición cosmética, así como el método de
15 tratamiento cosmético que comprende la aplicación de dicha composición cosmética constituyen objetos adicionales de esta invención.

Otro objeto adicional de esta invención lo constituye una composición farmacéutica que comprende, al menos, un péptido
20 de los proporcionados por esta invención, o, alternativamente, un vector que contiene un ácido nucleico que codifica un péptido de la invención. El empleo de los péptidos y vectores (construcciones) proporcionados por esta invención en la elaboración de dichas composiciones farmacéuticas, así como
25 el método de tratamiento del cuerpo humano o animal que comprende la aplicación de dicha composición cosmética constituyen objetos adicionales de esta invención.

Otro objeto adicional de la presente invención lo constituye una combinación de fármacos que comprende, al
30 menos, un péptido de los proporcionados por esta invención junto con, al menos, un fármaco destinado a una segunda diana terapéutica que puede ser igual o diferente a la diana terapéutica a la que va dirigido el péptido proporcionado por

esta invención.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

Esta invención proporciona un péptido derivado del extremo amino de la proteína SNAP-25. De forma más concreta, la invención proporciona un péptido, en adelante péptido de la invención, que tiene una secuencia de 3 a 30 aminoácidos contiguos contenidos en la SEC. ID. N°: 1 [véase el apartado relativo a la LISTA DE SECUENCIAS].

La invención también incluye péptidos sustancialmente homólogos al péptido de la invención. En el sentido utilizado en esta descripción, la expresión "sustancialmente homólogo" significa que el péptido en cuestión tiene una homología a nivel de aminoácidos de, al menos, un 60%, preferentemente de, al menos, un 80%, y, más preferentemente, de, al menos, un 95%.

La invención también incluye péptidos funcionalmente equivalentes al péptido de la invención. En el sentido utilizado en esta descripción, la expresión "funcionalmente equivalente" significa que el péptido en cuestión tiene, al menos, una de las actividades biológicas del péptido de la invención, por ejemplo, la capacidad de inhibir, al menos parcialmente, la exocitosis neuronal.

En una realización particular, el péptido de la invención tiene una longitud de 3 a 20 aminoácidos, preferentemente, de 6 a 19 aminoácidos.

Los aminoácidos que constituyen las unidades estructurales del péptido de la invención pueden tener la configuración D o L. El aminoácido del extremo amino puede tener el grupo amino terminal acetilado y el aminoácido del extremo carboxilo puede tener el grupo carboxilo terminal amidado. Por tanto, la presente invención también incluye derivados del péptido de la invención en los que el extremo

amino terminal está acetilado y/o en los que el extremo carboxilo terminal está amidado.

Ejemplos particulares de péptidos de la invención son los péptidos que tienen las secuencias de aminoácidos mostradas en SEC. ID. N°: 2 y SEC. ID. N°: 3.

Dentro del alcance de esta invención se encuentran las sales cosmética y/o farmacéuticamente aceptables del péptido de la invención. El término "sales cosmética y/o farmacéuticamente aceptables" incluye las sales habitualmente utilizadas para formar sales metálicas o sales de adición de ácidos o bases libres. La naturaleza de la sal no es crítica, siempre y cuando sea cosmética y/o farmacéuticamente aceptable. Las sales cosmética y/o farmacéuticamente aceptables del péptido de la invención pueden obtenerse a partir de ácidos o bases, orgánicos o inorgánicos, por métodos convencionales bien conocidos por los técnicos en la materia haciendo reaccionar el ácido o la base apropiados con el péptido de la invención.

Adicionalmente, el péptido de la invención puede sufrir modificaciones químicas reversibles con el fin de aumentar su biodisponibilidad (incluyendo la estabilidad y liposolubilidad) y su facilidad de paso de la barrera hematoencefálica y tejido epitelial. Ejemplos de tales modificaciones químicas reversibles incluyen la esterificación de los grupos carboxilato de los aminoácidos glutámico y aspártico con un grupo acetometilo, con lo que se elimina la carga negativa del aminoácido y se incrementa su hidrofobicidad. Esta esterificación es reversible ya que el enlace éster formado es reconocido por esterasas intracelulares que lo hidrolizan devolviendo la carga a los residuos de aspártico y glutámico. El efecto neto es una acumulación de péptido intracelular puesto que el péptido internalizado y desesterificado no puede atravesar la membrana

celular.

El péptido de la invención puede obtenerse por métodos convencionales de síntesis química de péptidos en fase sólida siguiendo la metodología basada en Fmoc y/o Boc (16).

5 Alternativamente, el péptido de la invención se puede obtener por métodos convencionales basados en la tecnología del ADN recombinante, por ejemplo, mediante un método que, brevemente, comprende insertar la secuencia de ácido nucleico que codifica el péptido de la invención en un plásmido o
10 vector apropiado, transformar células competentes para dicho plásmido o vector, y crecer dichas células bajo condiciones que permiten la expresión del péptido de la invención y, si se desea, aislar y, opcionalmente, purificar el péptido de la invención por métodos convencionales conocidos por los
15 expertos en la materia. La secuencia de ácido nucleico que codifica el péptido de la invención puede deducirse fácilmente de la correspondencia existente entre los aminoácidos y los codones de nucleótidos que codifican tales aminoácidos. En este caso, un objeto adicional de esta invención lo constituye
20 una secuencia de ácido nucleico aislado que codifica el péptido de la invención. En una realización particular, dicho ácido nucleico se selecciona entre ADN monocatenario, ADN bicatenario y ARN. Un objeto adicional de esta invención lo constituyen los plásmidos y vectores de expresión que
25 contienen dicha secuencia de ácido nucleico que codifica el péptido de la invención, así como células procarióticas o eucarióticas que expresan el péptido de la invención. Una revisión de los principios de la tecnología del ADN recombinante puede encontrarse, por ejemplo, en el libro de
30 texto titulado "Principles of Gene Manipulation: An Introduction to Genetic Engineering", R.W. Old & S.B. Primrose, editado por Blackwell Scientific Publications, 4ª edición (1989).

El péptido de la invención es capaz de inhibir, al menos parcialmente, la exocitosis neuronal, probablemente mediante un mecanismo que implica la interferencia en el ensamblaje del complejo proteico de fusión (SNARE) y/o su desestabilización
5 térmica.

La capacidad de los péptidos de la invención como inhibidores de la exocitosis neuronal (neurosecreción) se puso de manifiesto mediante un ensayo que evalúa la potencia de dichos péptidos en la inhibición de la liberación de catecolaminas inducida por calcio en células cromafines permeabilizadas con un detergente [véase el Ejemplo 1.2.1].
10 Brevemente, las células cromafines en cultivo se incuban con adrenalina y noradrenalina marcadas con tritio, se permeabilizan con digitonina, se estimulan con calcio y se
15 mide la cantidad de radiactividad liberada por las células al medio extracelular, que constituye un reflejo de la exocitosis de dichas catecolaminas marcadas.

El hexapéptido de la invención [SEC. ID. N°: 2], a una concentración de 1 mM, bloqueó aproximadamente el 20% de la liberación de catecolaminas (adrenalina y noradrenalina) en
20 células cromafines permeabilizadas, mientras que el péptido de 13 aminoácidos [SEC. ID. N°: 3], a una concentración de 1 mM inhibió un 35% aproximadamente de la liberación de catecolaminas en las células cromafines permeabilizadas.

Los péptidos mostrados en SEC. ID. N°: 5 y SEC. ID. N°: 6, procedentes del extremo carboxilo de SNAP-25 [SEC. ID. N°: 4] inhibieron la secreción inducida por Ca^{2+} en células cromafines permeabilizadas con digitonina en un 40% aproximadamente cuando se utilizaron a una concentración de
25
30 1 mM.

Ensayos paralelos efectuados utilizando conjuntamente, al menos, un péptido procedente del extremo amino de la SNAP-25, por ejemplo, el péptido de la SEC. ID. N°: 2 o de la SEC.

ID. N°: 3, y, al menos, un péptido procedente del extremo carboxilo de la SNAP-25, por ejemplo, el péptido de la SEC. ID. N°: 5 o de la SEC. ID. N°: 6, pusieron de manifiesto que el empleo conjunto de, al menos, un péptido procedente del extremo amino de la SNAP-25 y, al menos, un péptido procedente del extremo carboxilo de la SNAP-25, potencia la actividad biológica observada para cada uno de los péptidos ensayados por separado.

En un caso particular, se ensayaron mezclas de péptidos constituidas por uno de los péptidos mostrados en la SEC. ID. N°: 2 o en la SEC. ID. N°: 3 y uno de los péptidos mostrados en la SEC. ID. N°: 5 o en la SEC. ID. N°: 6, a una concentración de 0,5 mM de cada uno de ellos, obteniéndose un porcentaje de inhibición de liberación de catecolaminas en células cromafines permeabilizadas del 55%.

En su conjunto, estos resultados indican que ambos tipos de péptidos, tanto los procedentes del extremo amino como los procedentes del extremo carboxilo, inhiben la exocitosis de catecolaminas, y que el uso conjunto de péptidos procedentes del extremo amino y del extremo carboxilo potencia la actividad biológica observada para cada uno de ellos por separado.

Por tanto, la invención proporciona, además, una mezcla de péptidos que comprende:

- (a) al menos un péptido de la invención, y
- (b) al menos, un péptido que tiene una secuencia de 3 a 30 aminoácidos contiguos contenidos en la SEC. ID. N°: 4 [en adelante, péptido (COOH) para indicar su relación con el extremo carboxilo de la SNAP-25].

En una realización particular, dicha mezcla de péptidos está constituida por, al menos, un péptido seleccionado del grupo formado por los péptidos mostrados en la SEC. ID. N°: 2 y en la SEC. ID. N°: 3, y, al menos, un péptido seleccionado

del grupo formado por los péptidos mostrados en la SEC. ID. N°: 5 y en la SEC. ID. N°: 6.

La capacidad de los péptidos de la invención de interferir con la formación y la estabilidad del complejo de fusión (SNARE), se puso de manifiesto mediante la realización de unos ensayos de reconstitución *in vitro* del complejo proteico de fusión con proteínas recombinantes [véase el Ejemplo 1.2.2]. Brevemente, la proteína SNAP-25 se inmovilizó en placas de 96 pocillos, se añadieron las proteínas VAMP y syntaxina en presencia y/o ausencia de los péptidos de la invención y se evaluó la formación del complejo proteico de fusión (SNARE). La detección del complejo se realiza utilizando un anticuerpo contra la syntaxina (anti-syntaxina), seguido de un segundo anticuerpo marcado que reconoce al anticuerpo anti-syntaxina. Los datos obtenidos parecen indicar que la presencia de los péptidos de la invención durante el ensamblaje del complejo de fusión produce una disminución significativa del mismo. Por tanto, el mecanismo de la acción inhibidora de la exocitosis neuronal parece implicar que los péptidos de la invención interfieren en la formación y/o estabilidad del complejo proteico de fusión (SNARE).

Los resultados obtenidos con dichos ensayos sugieren que los péptidos de la invención, unos péptidos de pequeño tamaño, entre 3 y 30 aminoácidos, derivados de la secuencia aminoacídica del extremo amino de la SNAP-25, opcionalmente junto con péptidos procedentes del extremo carboxilo de la SNAP-25, actúan como inhibidores de la exocitosis neuronal. Dado que estos péptidos imitan las secuencias de proteínas neuronales involucradas en la exocitosis, su actividad es específica puesto que tan sólo interaccionan con las correspondientes proteínas neuronales sin afectar otros componentes celulares.

El mecanismo de acción de los péptidos de la invención

parece ser similar al de las toxinas botulínicas, afectando, por tanto, a la formación y/o estabilidad del complejo proteico de fusión, por lo que se puede considerar que los péptidos de la invención tengan aplicaciones cosmético-terapéuticas similares a las descritas para la toxina botulínica. Por tanto, los péptidos de la invención pueden convertirse en sustitutos efectivos, estables, seguros y económicos de las toxinas botulínicas tanto en el tratamiento de arrugas faciales y/o asimetría facial como en el tratamiento de la sintomatología de las enfermedades espasmódicas, y su empleo como neuroprotectores en el tratamiento de desórdenes neurológicos y enfermedades neurodegenerativas.

Los estudios realizados por los solicitantes sugieren, además, el concepto innovador del uso simultáneo de péptidos procedentes de los dominios N-terminal y C-terminal de SNAP-25 como moduladores de la exocitosis neuronal.

En su conjunto, los resultados obtenidos con los péptidos de la invención, junto con su estabilidad y simplicidad estructural y la diversidad química que se puede obtener atendiendo a la composición de los extremos amino y carboxilo de la SNAP-25, confieren a los péptidos de la invención un elevado potencial cosmético y/o terapéutico.

Los péptidos de la invención pueden ser utilizados con fines cosméticos y/o terapéuticos mediados por una exocitosis neuronal patológica.

Entre las aplicaciones cosméticas de los péptidos de la invención se encuentran el tratamiento y eliminación, total o parcial, de las arrugas faciales y/o de la asimetría facial en un ser humano.

La invención proporciona una composición cosmética que comprende una cantidad cosméticamente eficaz de, al menos, un péptido de la invención junto con al menos un adyuvante

cosméticamente aceptable. Adicional y opcionalmente, dicha composición cosmética puede contener uno de los péptidos identificados como péptido (COOH).

5 Para sus aplicaciones cosméticas, los péptidos de la invención pueden aplicarse por cualquier medio que produzca el contacto del péptido con el sitio de acción del mismo en el cuerpo de un mamífero, preferiblemente el ser humano.

10 La cantidad de péptido cosméticamente eficaz que debe aplicarse así como su dosificación para el tratamiento de las arrugas faciales y/o de la asimetría facial con los péptidos y/o composiciones cosméticas de la invención dependerá de numerosos factores, incluyendo la edad, estado del sujeto que desea el tratamiento, la severidad de las arrugas y/o de la asimetría facial, la ruta y la frecuencia de aplicación y el
15 péptido particular a utilizar.

Las composiciones cosméticas que contienen los péptidos de la invención pueden presentarse en cualquier forma de aplicación adecuada, por ejemplo, sólida, líquida o semisólida, tales como cremas, pomadas, geles o soluciones,
20 y pueden aplicarse por cualquier vía apropiada, preferentemente, por vía tópica, para lo cual incluirán los adyuvantes cosméticamente aceptables necesarios para la formulación de la forma de administración deseada. En una realización particular y preferida, los péptidos de la
25 invención se encapsulan en liposomas, opcionalmente junto con otro u otros péptidos (COOH), que se incorporan a los otros componentes de la preparación cosmética. Una revisión de las distintas formas cosméticas de aplicación de compuestos activos y de los adyuvantes necesarios para la obtención de
30 las mismas puede encontrarse, por ejemplo, en el libro de texto "Cosmetología de Harry", Wilkinson & Moore, Ed. Díaz de Santos (1990).

Por tanto, un objeto adicional de esta invención lo

constituye el empleo de los péptidos de la invención en la elaboración de composiciones cosméticas para el tratamiento de las arrugas faciales y/o de la asimetría facial.

La invención proporciona también un método para el
5 tratamiento cosmético en un mamífero, preferentemente, en el ser humano, de las arrugas faciales y/o de la asimetría facial que comprende aplicar a dicho mamífero que tiene arrugas faciales y/o asimetría facial, una cantidad cosméticamente eficaz de al menos un péptido de la invención, opcionalmente
10 junto con uno o más péptidos (COOH), preferentemente en forma de una composición cosmética que lo contiene.

Adicionalmente, los péptidos de la invención son adecuados para el tratamiento de las enfermedades espasmódicas, por ejemplo, distonías, estrabismo,
15 blefarospasmo, tortícolis, tics, etc.; y/o como neuroprotectores en el tratamiento de desórdenes neurológicos y/o enfermedades neurodegenerativas.

Entre dichos desórdenes neurológicos se encuentran las dolencias neurológicas agudas, por ejemplo, las que tienen
20 lugar en las primeras etapas de la isquemia cerebral. Es conocido que durante un proceso isquémico se produce una liberación incontrolada en la zona afectada del neurotransmisor glutamato. Este neurotransmisor interacciona con receptores específicos de membrana neuronal provocando una
25 entrada masiva de iones calcio al interior de la neurona. El calcio intracelular provoca la liberación de más glutamato, desencadenándose de este modo una reacción en cadena. Además, la entrada masiva y prolongada de calcio dentro de las neuronas provoca su muerte lo que se traduce en la aparición
30 de tejido necrótico en la zona isquémica. Claramente, el progreso del daño isquémico puede frenarse, al menos parcialmente, si se controla la exocitosis incontrolada del glutamato. Por tanto, los péptidos de la invención, por su

capacidad de inhibir la exocitosis pueden resultar adecuados para prevenir y/o ralentizar la muerte neuronal característica del proceso isquémico, por lo que son útiles en el tratamiento de neuropatologías que ocurren por una exocitosis excesiva del glutamato como, por ejemplo, demencia senil, demencia de Alzheimer, demencia asociada al SIDA, epilepsia, esclerosis amiotrófica, esclerosis lateral múltiple, etc. En este caso, la aplicación en el tratamiento de dolencias neurológicas sería similar a la descrita para la toxina botulínica A (18).

Los péptidos de la invención podrían formar parte, por tanto, de una terapia combinada (dirigida a varias dianas terapéuticas) cuyo objetivo fuese frenar más eficazmente la neurodegeneración.

Un objeto adicional de esta invención lo constituye una composición farmacéutica que comprende una cantidad terapéuticamente eficaz de al menos un péptido de la invención junto con al menos un excipiente farmacéuticamente aceptable. En una realización particular, dicha composición farmacéutica contiene, además, uno o más péptidos (COOH). Alternativamente, la composición farmacéutica de la invención puede contener una cantidad terapéuticamente eficaz de un vector que contiene, al menos, una secuencia de ácido nucleico que codifica un péptido de la invención, junto con al menos un adyuvante y/o un excipiente farmacéuticamente aceptable. Dicho vector puede ser utilizado en terapia génica.

Los productos activos de la invención (péptidos o vectores) pueden administrarse para el tratamiento de la exocitosis neuronal patológica, manifestada, por ejemplo, por enfermedades espasmódicas, desórdenes neurológicos o enfermedades neuro-degenerativas, por cualquier medio que produzca el contacto del péptido con el sitio de acción del mismo en el cuerpo de un mamífero, preferiblemente el ser humano.

La cantidad de producto activo de la invención [péptidos o vectores (construcciones)] terapéuticamente eficaz que debe administrarse así como su dosificación para tratar un estado patológico con los péptidos y/o composiciones farmacéuticas de la invención dependerá de numerosos factores, incluyendo la edad, estado del paciente, la severidad de la alteración o trastorno, la ruta y frecuencia de administración y el péptido particular a utilizar.

Las composiciones farmacéuticas que contienen los péptidos o los vectores (construcciones) de la invención pueden presentarse en cualquier forma de administración apropiada, por ejemplo, sólida, líquida o semisólida, tales como pomadas, cremas, geles o soluciones, y pueden administrarse por cualquier vía apropiada, por ejemplo, por vía oral, parenteral o tópica, para lo cual incluirán los excipientes farmacéuticamente aceptables necesarios para la formulación de la forma de administración deseada. Una revisión de las distintas formas farmacéuticas de administración de medicamentos y de los excipientes necesarios para la obtención de las mismas puede encontrarse, por ejemplo, en el "Tratado de Farmacia Galénica", C. Faulí i Trillo, 1993, Luzán 5, S.A. Ediciones, Madrid.

Como se ha mencionado previamente, los péptidos de la invención podrían formar parte de una terapia combinada con el fin de frenar la neurodegeneración de forma más eficaz. En este caso, la invención proporciona una composición farmacéutica que comprende, al menos un péptido de la invención, opcionalmente junto con otro u otros compuestos inhibidores de la exocitosis neuronal, y junto con, al menos, un fármaco destinado a otra diana terapéutica, seleccionado del grupo formado por un bloqueante de los receptores de glutamato neuronales, un agente quelante de calcio, un antioxidante, un destructor de radicales libres y sus mezclas.

En una realización particular, dicha composición útil en una terapia combinada puede contener, al menos, un péptido de la invención, opcionalmente junto con otro u otros compuestos capaces de inhibir la exocitosis neuronal y un bloqueante de los receptores de glutamato neuronales. En otra realización de esta invención dicha composición podría contener, al menos, un péptido de la invención, opcionalmente junto otro u otros compuestos capaces de inhibir la exocitosis neuronal, un bloqueante de los receptores de glutamato neuronales, un agente quelante de calcio, un antioxidante y/o un destructor de radicales libres. Entre los compuestos capaces de inhibir la exocitosis neuronal se encuentran los péptidos procedentes del extremo carboxilo de la SNAP-25 identificados como péptidos (COOH). Otros muchos ejemplos de composiciones pueden ser planteados, teniendo todos ellos en común la necesidad de controlar la exocitosis de neurotransmisores.

Un objeto adicional de esta invención lo constituye el empleo de los péptidos de la invención o de vectores que contienen al menos una secuencia que codifica un péptidos de la invención, en la elaboración de un medicamento para el tratamiento de enfermedades y/o alteraciones patológicas mediadas por la exocitosis neuronal patológica, por ejemplo, enfermedades espasmódicas, desórdenes neurológicos y/o enfermedades neurodegenerativas.

La invención proporciona, además, un método para el tratamiento en un mamífero de enfermedades y alteraciones patológicas mediadas por la exocitosis neuronal patológica, por ejemplo, enfermedades espasmódicas, desórdenes neurológicos y/o enfermedades neurodegenerativas, que comprende administrar a dicho mamífero que padece dicha enfermedad o alteración patológica una cantidad terapéuticamente eficaz de, al menos, un péptido de la invención, o de un vector que contiene al menos una secuencia

de ADN que codifica un péptido de la invención, preferiblemente, en forma de una composición farmacéutica que lo contiene. En una realización particular de esta invención dicha composición farmacéutica contiene, además del péptido
5 o péptidos de la invención, uno o más péptidos (COOH).

Los siguientes ejemplos sirven para ilustrar la naturaleza de la presente invención y no deben ser considerados en sentido limitativo de la misma.

10

EJEMPLO 1

Péptidos inhibidores de la exocitosis de neurotransmisores

1.1 Síntesis de péptidos

Se han sintetizado los péptidos mostrados en SEC. ID. N°: 2, SEC. ID. N°: 3, SEC. ID. N°: 5 y SEC. ID. N°: 6 mediante
15 métodos convencionales de síntesis de péptidos en fase sólida utilizando la metodología sintética basada en Fmoc y/o Boc (16). Los péptidos resultantes se purificaron por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) y se analizaron por espectrometría de masas.

20

1.2 Evaluación de la actividad biológica

Para evaluar la actividad biológica de los péptidos obtenidos en el Ejemplo 1.1 se desarrolló un ensayo que evalúa la potencia de dichos péptidos en la inhibición de la
25 liberación de catecolaminas inducida por calcio en células cromafines y un ensayo de reconstitución *in vitro* del complejo de fusión (SNARE).

1.2.1 Inhibición de la liberación de catecolaminas

30

Se realizó este ensayo para comprobar la capacidad de los péptidos sintetizados en el Ejemplo 1.1 como inhibidores de la exocitosis neuronal. En este ensayo se evalúa la potencia de dichos péptidos en la inhibición de la liberación de

catecolaminas (noradrenalina y adrenalina) inducida por calcio en células cromafines (obtenidas de glándulas suprarrenales bovinas) permeabilizadas con el detergente digitonina, según el método descrito por Gutiérrez et al. (1995 y 1997).

5 Brevemente, las células cromafines en cultivo se incuban con [³H]-adrenalina y [³H]-noradrenalina, se permeabilizan con digitonina 20 µM, y se estimulan con calcio (10 µM), en presencia de los péptidos a ensayar (separados o mezclados), y se mide la cantidad de radiactividad liberada por las
10 células al medio extracelular, lo que constituye un reflejo de la exocitosis de [³H]-adrenalina y [³H]-noradrenalina.

Los resultados obtenidos en la inhibición de la liberación de catecolaminas en células cromafines permeabilizadas fueron los siguientes:

15 a) el péptido de la SEC. ID. N°: 2, procedente del extremo amino de la SNAP-25, a una concentración de 1 mM, bloqueó aproximadamente el 20% de la liberación de catecolaminas en células cromafines permeabilizadas;

20 b) el péptido de la SEC. ID. N°: 3, procedente del extremo amino de la SNAP-25, a una concentración de 1 mM, inhibió aproximadamente un 35% de la liberación de catecolaminas en células cromafines permeabilizadas;

25 c) los péptidos de las SEC. ID. N°: 5 y SEC. ID. N°: 6, procedentes del extremo carboxilo de la SNAP-25, a una concentración de 1 mM, inhibieron la secreción inducida por Ca²⁺ en células cromafines permeabilizadas con digitonina en un 40% aproximadamente; y

30 d) mezclas de péptidos constituidas por uno de los péptidos mostrados en la SEC. ID. N°: 2 o en la SEC. ID. N°: 3 y uno de los péptidos mostrados en la SEC. ID. N°: 5 o en la SEC. ID. N°: 6, a una concentración de 0,5 mM de cada de ellos, inhibieron la liberación de catecolaminas en células cromafines permeabilizadas en un 55% aproximadamente.

En su conjunto, estos resultados indican que ambos tipos de péptidos, tanto los procedentes del extremo amino como los procedentes del extremo carboxilo, inhiben la exocitosis de catecolaminas, y que el uso conjunto de péptidos procedentes del extremo amino y del extremo carboxilo potencia la actividad biológica observada para cada uno de ellos por separado.

1.2.2 Reconstitución in vitro

Se realizó este ensayo para determinar la capacidad de los péptidos obtenidos en el Ejemplo 1.1 de interferir con la formación y la estabilidad del complejo de fusión (SNARE). El ensayo consiste en evaluar la reconstitución *in vitro* del complejo proteico de fusión con proteínas recombinantes producidas en *Escherichia coli*. Los ensayos de reconstitución basados en métodos de ELISA (Enzyme-Linked Immuno Assay), implican la inmovilización de la proteína SNAP-25 en placas de 96 pocillos y la subsiguiente formación del complejo proteico de fusión añadiendo las proteínas VAMP y syntaxina en presencia y/o ausencia de los péptidos de la invención. La detección del complejo se realiza utilizando un anticuerpo contra la proteína syntaxina (anti-syntaxina), seguido de un anticuerpo que reconoce al anticuerpo anti-syntaxina marcado covalentemente con una peroxidasa. La cantidad de complejo proteico de fusión se siguió añadiendo dicloruro de 1,2-fenilneodiamina cuya reacción con la peroxidasa origina un producto con color amarillento-anaranjado que absorbe a 492 nm en medio ácido.

Los datos obtenidos pusieron de manifiesto que la presencia de los péptidos obtenidos en el Ejemplo 1.1 durante el ensamblaje del complejo de fusión produce una disminución significativa del mismo. Por tanto, el mecanismo de acción de dichos péptidos parece implicar la interferencia de tales

péptidos en la formación y/o estabilidad del complejo proteico de fusión (SNARE).

BIBLIOGRAFÍA

- 5 1. Schiavo, G., Rossetto O. y Montecucco C. Bases Moleculares del tétanos y del botulismo. *Investigación y Ciencia* 234, 46-55.
2. Montecucco, C. and Schiavo, G. (1994). Mechanism of action of tetanus and botulinum neurotoxins. *Mol. Microbiol.* 13, 1-8.
- 10 3. Schiavo, G., Rosetto, O., Benfenati, F., Poulain, B. and Montecucco, C. (1994). Tetanus and botulinum neurotoxins are zinc proteases specific for components of the neuroexocytosis apparatus. *Ann. NY Acad. Sci.* 710, 65-75.
- 15 4. Calakos, N. and Scheller, R.H. (1996). Synaptic vesicle biogenesis, docking and fusion: a molecular description. *Physiol. Rev.* 76, 1-29.
5. Sutton, R.B., Fasshauer, D., Jahn, R. y Brunger, A.T. (1998). Crystal structure of a SNARE complex involved in synaptic exocytosis at 2.4A resolution. *Nature* 395, 347-353.
- 20 6. Jankovic, J. and Brin, F.M. (1991). Therapeutic uses of botulinum toxin. *New Engl. J. Med.* 324, 1186-1194.
- 25 7. Jankovic, J. (1994). Botulinum toxin in movement disorders. *Curr. Opin. Neurol.* 6, 358-366.
8. Jankovic J. y Brin M.F. (1997). Botulinum toxin: historical perspective and potential new indications. *Muscle Nerve Suppl.* 6, S129-S145.
- 30 9. Davis, L.E. (1993). Botulinum toxin-from poison to medicine. *West J. Med.* 128, 25-28.
10. Hughes, A.J. (1994). Botulinum toxin in clinical practise. *Drugs* 48, 888-893.

11. Hambleton, P. (1992). *Clostridium botulinum* toxins a general review of involvement in disease, structure, mode of action and preparation for clinical use. *J. Neurol.* **239**, 16-20.
- 5 12. Borodic, G.E. and Pearces, L.B. (1994). New concepts in botulinum toxin therapy. *Drug Safety* **11**, 145-152.
13. Brin, M.F., Blitzler, A., Stewart, C., Pine, Z., Borg-Stein, J., Miller J., Nagalapura, N.S., and Rosenfeld, D.B. (1993). Disorders with excessive muscle contraction: Candidates for treatment with intramuscular botulinum toxin ("BoTox"). *Botulinum and Tetanus Neurotoxins* (Ed. B.R. DasGupata), 559-576.
- 10 14. Gutiérrez, L.M., Canaves J., Ferrer-Montiel, A.V., Reig, J.A., Montal, M., and Viniegra, S. (1995). A peptide that mimics the carboxy terminal domain of SNAP25 blocks Ca^{2+} -dependent exocytosis in chromaffin cells. *FEBS Lett* **372**, 39-43.
- 15 15. Augine, G.J., Burns, M.E., DeBello W.M. and Schweizer, F.E. (1996). Exocytosis: Proteins and perturbations. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* **36**, 659-701.
- 20 16. Pennington, M.W. y Dunn, B.N. (1994). Peptide synthesis protocols. Humana Press, Totowa.
17. Gutiérrez, L.M., Viniegra, S., Rueda, J., Ferrer-Montiel, A.V., Canaves, J.M. and Montal. M. (1997). A peptide that mimics the C-terminal sequence of SNAP-25 inhibits secretory vesicle docking in chromaffin cells. *J. Biol. Chem.* **272**, 2634-2639.
- 25 18. Clarke, C.E. (1992). Therapeutic potential of botulinum toxin in neurological disorders. *Quart. J. Med.* **299**, 197-205.
- 30

REIVINDICACIONES

1. Un péptido caracterizado porque tiene una secuencia de 3 a 30 aminoácidos contiguos contenidos en la SEC. ID. N°:

5 1.

2. Péptido según la reivindicación 1, caracterizado porque es sustancialmente homólogo a un péptido que tiene una secuencia de 3 a 30 aminoácidos contiguos contenidos en la SEC. ID. N°: 1.

10

3. Péptido funcionalmente equivalente a un péptido según la reivindicación 1 ó 2, caracterizado porque es capaz de inhibir, al menos parcialmente, la exocitosis neuronal.

15

4. Péptido según la reivindicación 1, caracterizado porque tiene una longitud de 3 a 20 aminoácidos, preferentemente, de 6 a 19 aminoácidos.

20

5. Péptido según la reivindicación 1, caracterizado porque dichos aminoácidos tienen la configuración D.

6. Péptido según la reivindicación 1, caracterizado porque dichos aminoácidos tienen la configuración L.

25

7. Péptido según la reivindicación 1, caracterizado porque el aminoácido del extremo amino tiene el grupo amino terminal acetilado.

30

8. Péptido según la reivindicación 1, caracterizado porque el aminoácido del extremo carboxilo tiene el grupo carboxilo terminal amidado.

9. Péptido según la reivindicación 1, caracterizado porque tiene una secuencia de aminoácidos seleccionada entre las secuencias de aminoácidos mostradas en SEC. ID. N°: 2 y SEC. ID. N°: 3.

5

10. Péptido según la reivindicación 1, caracterizado porque contiene, además, una modificación reversible con el fin de aumentar su biodisponibilidad y facilidad de paso de la barrera hematoencefálica y tejido epitelial.

10

11. Una secuencia de ácido nucleico aislado caracterizada porque codifica un péptido según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10.

15

12. Secuencia de ácido nucleico según la reivindicación 11, caracterizado porque dicho ácido nucleico se selecciona entre ADN bicatenario, ADN monocatenario y ARN.

20

13. Un plásmido caracterizado porque contiene una secuencia de ácido nucleico según la reivindicación 11.

14. Un vector de expresión caracterizado porque contiene una secuencia de ácido nucleico según la reivindicación 11.

25

15. Una célula procariótica o eucariótica caracterizada porque expresa un péptido según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10.

30

16. Una mezcla de péptidos caracterizada porque está formada por:

(a) al menos un péptido según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, y

(b) al menos, un péptido que tiene una secuencia de 3 a

30 aminoácidos contiguos contenidos en la SEC. ID. N°: 4.

17. Mezcla según la reivindicación 16, caracterizada porque está formada por:

5 (a) al menos, un péptido seleccionado del grupo formado por los péptidos mostrados en la SEC. ID. N°: 2 y en la SEC. ID. N°: 3, y

(b) al menos, un péptido seleccionado del grupo formado por los péptidos mostrados en la SEC. ID. N°: 5 y en la SEC.
10 ID. N°: 6.

18. Una composición cosmética que comprende una cantidad cosméticamente eficaz de, al menos, un péptido según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, junto con, al
15 menos, un adyuvante cosméticamente aceptable.

19. Composición cosmética según la reivindicación 18, que comprende, opcionalmente además, al menos, un péptido que tiene una secuencia de 3 a 30 aminoácidos contiguos contenidos
20 en la SEC. ID. N°: 4.

20. Empleo de un péptido según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, en la elaboración de una composición cosmética para el tratamiento de las arrugas faciales y/o de
25 la asimetría facial.

21. Un método para el tratamiento cosmético en un ser humano de las arrugas faciales y/o de la asimetría facial que comprende aplicar a dicho ser humano que tiene arrugas
30 faciales y/o asimetría facial, una cantidad cosméticamente eficaz de, al menos, un péptido según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, opcionalmente junto con uno o más péptidos que tienen una secuencia de 3 a 30 aminoácidos

contiguos contenidos en la SEC. ID. N°: 4, preferentemente, en forma de una composición cosmética según cualquiera de las reivindicaciones 18 ó 19.

5 22. Una composición farmacéutica que comprende una cantidad terapéuticamente eficaz de, al menos, un péptido según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, junto con, al menos, un excipiente farmacéuticamente aceptable.

10 23. Composición farmacéutica según la reivindicación 22, que comprende, opcionalmente además, uno o más péptidos que tienen una secuencia de 3 a 30 aminoácidos contiguos contenidos en la SEC. ID. N°: 4.

15 24. Composición farmacéutica según la reivindicación 22, que comprende, opcionalmente además, un fármaco seleccionado del grupo formado por un bloqueante de los receptores de glutamato neuronales, un agente quelante de calcio, un antioxidante, un destructor de radicales libres y sus mezclas, y, opcionalmente, otro u otros compuestos inhibidores de la
20 exocitosis neuronal.

25 25. Composición según la reivindicación 24, que comprende, opcionalmente además, uno o más péptidos que tienen una secuencia de 3 a 30 aminoácidos contiguos contenidos en la SEC. ID. N°: 4.

30 26. Una composición farmacéutica que comprende una cantidad terapéuticamente eficaz de un vector que contiene, al menos, una secuencia de ácido nucleico según la reivindicación 11, que codifica un péptido según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, junto con al menos un adyuvante y/o un excipiente farmacéuticamente aceptable.

27. Empleo de un péptido según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10 en la elaboración de un medicamento para el tratamiento de enfermedades y/o alteraciones patológicas mediadas por la exocitosis neuronal patológica.

5

28. Empleo de un vector que contiene, al menos, una secuencia de ácido nucleico según la reivindicación 11, que codifica un péptido según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, en la elaboración de un medicamento para el
10 tratamiento de enfermedades y/o alteraciones patológicas mediadas por la exocitosis neuronal patológica.

LISTA DE SECUENCIAS

(1) INFORMACION GENERAL:

5 (i) SOLICITANTE:

(A) NOMBRE: UNIVERSIDAD MIGUEL HERNANDEZ

(B) CALLE: Monóvar s/n

(C) CIUDAD: Elche

(D) PROVINCIA: Alicante

10 (E) PAIS: ES

(F) CODIGO POSTAL (ZIP): 03206

(G) TELEFONO: 96 665 8727

(H) FAX: 96 665 8680

15 (ii) TITULO DE LA INVENCION:

PEPTIDOS INHIBIDORES DE LA EXOCITOSIS NEURONAL,
COMPOSICIONES COSMETICAS Y FARMACEUTICAS QUE LOS
CONTIENEN

20 (iii) NUMERO DE SECUENCIAS: 6

(iv) FORMA LEGIBLE POR ORDENADOR:

(A) TIPO DE SOPORTE: Floppy disk

(B) ORDENADOR: IBM PC compatible

25 (C) SISTEMA OPERATIVO: PC-DOS/MS-DOS

(D) SOFTWARE: PatentIn Release #1.0, Version
#1.30 (OEP)

(2) INFORMACION DE LA SEC. ID. N°: 1

30 (i) CARACTERISTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 82 aminoácidos

(B) TIPO: aminoácido

(C) NUMERO DE CADENAS: sencilla

(D) TOPOLOGIA: lineal

(ii) TIPO DE MOLECULA: Péptido

(xi) DESCRIPCION DE LA SECUENCIA: SEC. ID. N°: 1:

5 Ala Glu Asp Ala Asp Met Arg Asn Glu Leu Glu Glu Met Gln Arg
Arg
1 5 10 15

Ala Asp Gln Leu Ala Asp Glu Ser Leu Glu Ser Thr Arg Arg Met
10 Leu
20 25 30

Gln Leu Val Glu Glu Ser Lys Asp Ala Ile Arg Thr Leu Val Met
Leu
15 35 40 45

Asp Glu Gln Gly Glu Gln Leu Glu Arg Ile Glu Glu Gly Met Asp
Gln
50 55 60

20 Ile Asn Lys Asp Met Lys Glu Ala Glu Lys Asn Leu Thr Asp Leu
Gly
65 70 75

80
25 Lys Phe

(2) INFORMACION DE LA SEC. ID. N°: 2:

(i) CARACTERISTICAS DE LA SECUENCIA:

- 30 (A) LONGITUD: 6 aminoácidos
(B) TIPO: aminoácido
(C) NUMERO DE CADENAS: sencilla
(D) TOPOLOGIA: lineal

(ii) TIPO DE MOLECULA: Péptido

(xi) DESCRIPCION DE LA SECUENCIA: SEC. ID. N°: 2:

Glu Glu Met Gln Arg Arg

5 1 5

(2) INFORMACION DE LA SEC. ID. N°: 3:

(i) CARACTERISTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 13 aminoácidos

10 (B) TIPO: aminoácido

(C) NUMERO DE CADENAS: sencilla

(D) TOPOLOGIA: lineal

(ii) TIPO DE MOLECULA: Péptido

(xi) DESCRIPCION DE LA SECUENCIA: SEC. ID. N°: 3:

15

Glu Leu Glu Glu Met Gln Arg Arg Ala Asp Gln Leu Ala

1 5 10

(2) INFORMACION DE LA SEC. ID. N°: 4:

20 (i) CARACTERISTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 86 aminoácidos

(B) TIPO: aminoácido

(C) NUMERO DE CADENAS: sencilla

(D) TOPOLOGIA: lineal

25 (ii) TIPO DE MOLECULA: Péptido

(xi) DESCRIPCION DE LA SECUENCIA: SEC. ID. N°: 4:

Val Asp Glu Arg Glu Gln Met Ala Ile Ser Gly Gly Phe Ile Arg
Arg

30 1 5 10 15

Val Thr Asn Ala Arg Glu Asn Glu Glu Met Asp Glu Asn Leu Glu
Gln

20

25

30

4

Val Ser Gly Ile Leu Gly Asn Leu Arg His Met Ala Leu Asp Met
Gly

35

40

45

5

Asn Glu Ile Asp Thr Gln Asn Arg Gln Ile Asp Arg Ile Met Glu
Lys

50

55

60

10

Ala Asp Ser Asn Lys Thr Arg Ile Asp Glu Ala Asn Gln Arg Ala
Thr

65

70

75

80

15

Lys Met Leu Gly Ser Gly

85

(2) INFORMACION DE LA SEC. ID. N°: 5:

(i) CARACTERISTICAS DE LA SECUENCIA:

20

(A) LONGITUD: 18 aminoácidos

(B) TIPO: aminoácido

(C) NUMERO DE CADENAS: sencilla

(D) TOPOLOGIA: lineal

(ii) TIPO DE MOLECULA: Péptido

25

(xi) DESCRIPCION DE LA SECUENCIA: SEC. ID. N°: 5:

Arg Ile Met Glu Lys Ala Asp Ser Asn Lys Thr Arg Ile Asp Glu
Ala

1

5

10

15

30

Asn Gln

(2) INFORMACION DE LA SEC. ID. N°: 6:

(i) CARACTERISTICAS DE LA SECUENCIA:

5

(A) LONGITUD: 19 aminoácidos

(B) TIPO: aminoácido

(C) NUMERO DE CADENAS: sencilla

5 (D) TOPOLOGIA: lineal

(ii) TIPO DE MOLECULA: Péptido

(xi) DESCRIPCION DE LA SECUENCIA: SEC. ID. N°: 6:

Ala Asp Ser Asn Lys Thr Arg Ile Asp Glu Ala Asn Gln Arg Ala
10 Thr
1 5 10 15

Lys Met Le

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/ ES 00/00058

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC7 C07K 14/47, A61K 38/17

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC7 C07K, A61K

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

EPODOC, PAJ, WPIL, REG, CA

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 9734620 A1 (THE REGENTS OF THE UNIVERSITY OF CALIFORNIA) 25 September 1997 (25 09.97), the whole document, specially page 25, SEQ.ID.NO 11-13	1-8, 10-16, 18-28
A	GUTIERREZ, L.M. et al. "A peptide that mimics the C-terminal sequence of SNAP-25 inhibits secretory vesicle docking in chromaffin cells". THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY. Vol.272, No 5, 31 January 1997, (31.01.97), pages 2634-2639, the whole document	1-28
A	OYLER, G.A. et al. "The identification of a novel synaptosomal-associated protein, SNAP-25, differentially expressed by neuronal subpopulations". THE JOURNAL OF CELL BIOLOGY. Vol.109, No 6, December 1989 (12.89), pages 3039-3052, the whole document.	1-28

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C.

☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier document but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

26 April 2000 (26.04.00)

Date of mailing of the international search report

19 May 2000 (19.05.00)

Name and mailing address of the ISA/

Authorized officer

Facsimile No. S.P.T.O.

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/ES 00/00058

Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 1 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☒ Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:

3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 2 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:

4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

☐

The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.

☐

No protest accompanied the payment of additional search fees.

International Application No
PCT/ES 00058

Form PCT/ISA/210 (patent family annex) (July 1992)

INFORME DE BÚSQUEDA INTERNACIONAL

Solicitud internacional n°
PCT/ ES 00/00058

A. CLASIFICACIÓN DEL OBJETO DE LA SOLICITUD

CIP⁷ C07K 14/47, A61K 38/17

De acuerdo con la Clasificación Internacional de Patentes (CIP) o según la clasificación nacional y la CIP.

B. SECTORES COMPRENDIDOS POR LA BÚSQUEDA

Documentación mínima consultada (sistema de clasificación, seguido de los símbolos de clasificación)

CIP⁷ C07K, A61K

Otra documentación consultada, además de la documentación mínima, en la medida en que tales documentos formen parte de los sectores comprendidos por la búsqueda

Bases de datos electrónicas consultadas durante la búsqueda internacional (nombre de la base de datos y, si es posible, términos de búsqueda utilizados)

EPODOC, PAJ, WPIL, REG, CA

C. DOCUMENTOS CONSIDERADOS RELEVANTES

Categoría*	Documentos citados, con indicación, si procede, de las partes relevantes	Relevante para las reivindicaciones n°
X	WO 9734620 A1 (THE REGENTS OF THE UNIVERSITY OF CALIFORNIA), 25.09.1997, todo el documento, especialmente página 25, SEQ.ID.NO 11-13.	1-8, 10-16, 18-28
A	GUTIERREZ, L.M. et al. "A peptide that mimics the C-terminal sequence of SNAP-25 inhibits secretory vesicle docking in chromaffin cells". THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY. Vol.272, No 5, 31 enero 1997, páginas 2634-2639, todo el documento.	1-28
A	OYLER, G.A. et al. "The identification of a novel synaptosomal-associated protein, SNAP-25, differentially expressed by neuronal subpopulations". THE JOURNAL OF CELL BIOLOGY. Vol.109, No 6, diciembre 1989, páginas 3039-3052, todo el documento.	1-28

☐ En la continuación del recuadro C se relacionan otros documentos ☒ Los documentos de familia de patentes se indican en el anexo

* Categorías especiales de documentos citados:

"A" documento que define el estado general de la técnica no considerado como particularmente relevante.

"E" solicitud de patente o patente anterior pero publicada en la fecha de presentación internacional o en fecha posterior.

"L" documento que puede plantear dudas sobre una reivindicación de prioridad o que se cita para determinar la fecha de publicación de otra cita o por una razón especial (como la indicada).

"O" documento que se refiere a una divulgación oral, a una utilización, a una exposición o a cualquier otro medio.

"P" documento publicado antes de la fecha de presentación internacional pero con posterioridad a la fecha de prioridad reivindicada.

"T" documento ulterior publicado con posterioridad a la fecha de presentación internacional o de prioridad que no pertenece al estado de la técnica pertinente pero que se cita por permitir la comprensión del principio o teoría que constituye la base de la invención.

"X" documento particularmente relevante; la invención reivindicada no puede considerarse nueva o que implique una actividad inventiva por referencia al documento aisladamente considerado.

"Y" documento particularmente relevante; la invención reivindicada no puede considerarse que implique una actividad inventiva cuando el documento se asocia a otro u otros documentos de la misma naturaleza, cuya combinación resulta evidente para un experto en la materia.

"&" documento que forma parte de la misma familia de patentes.

Fecha en que se ha concluido efectivamente la búsqueda internacional. 26 abril 2000 (26.04.2000)

Fecha de expedición del informe de búsqueda internacional

19 MAY 2000 19.05.00

Nombre y dirección postal de la Administración encargada de la búsqueda internacional O.E.P.M.

C/Panamá 1, 28071 Madrid, España.
n° de fax +34 91 3495304

Funcionario autorizado
M. NOVOA SANJURJO

n° de teléfono + 34 91 3495552

INFORME DE BÚSQUEDA INTERNACIONAL

Solicitud internacional n°

PCT/ ES00/00058

Recuadro I Observaciones cuando se estime que algunas reivindicaciones no pueden ser objeto de búsqueda (Continuación del punto 1 de la primera hoja)

De conformidad con el artículo 17.2.a), algunas reivindicaciones no han podido ser objeto de búsqueda por los siguientes motivos:

1. ☒ Las reivindicaciones n°: 21 se refieren a un objeto con respecto al cual esta Administración no está obligada a proceder a la búsqueda, a saber: Aunque la reivindicación se refiere a un método de tratamiento aplicado directamente al cuerpo humano, la búsqueda se ha realizado en relación a los efectos de los compuestos/composición.
2. ☐ Las reivindicaciones n°: se refieren a elementos de la solicitud internacional que no cumplen con los requisitos establecidos, de tal modo que no pueda efectuarse una búsqueda provechosa, concretamente:
3. ☐ Las reivindicaciones n°: son reivindicaciones dependientes y no están redactadas de conformidad con los párrafos segundo y tercero de la regla 6.4.a).

Recuadro II Observaciones cuando falta unidad de invención (Continuación del punto 2 de la primera hoja)

La Administración encargada de la Búsqueda Internacional ha detectado varias invenciones en la presente solicitud internacional, a saber:

1. ☐ Dado que todas las tasas adicionales han sido satisfechas por el solicitante dentro del plazo, el presente informe de búsqueda internacional comprende todas las reivindicaciones que pueden ser objeto de búsqueda.
2. ☐ Dado que todas las reivindicaciones que pueden ser objeto de búsqueda pueden serlo sin un esfuerzo particular que justifique una tasa adicional, esta Administración no ha invitado al pago de ninguna tasa de esta naturaleza.
3. ☐ Dado que tan sólo una parte de las tasas adicionales solicitadas ha sido satisfecha dentro del plazo por el solicitante, el presente informe de búsqueda internacional comprende solamente aquellas reivindicaciones respecto de las cuales han sido satisfechas las tasas, concretamente las reivindicaciones n°:
4. ☐ Ninguna de las tasas adicionales solicitadas ha sido satisfecha por el solicitante dentro de plazo. En consecuencia, el presente informe de búsqueda internacional se limita a la invención mencionada en primer término en las reivindicaciones, cubierta por las reivindicaciones n°:

Indicación en cuanto a la reserva ☐ Las tasas adicionales han sido acompañadas de una reserva por parte del solicitante.
☐ El pago de las tasas adicionales no ha sido acompañado de ninguna reserva.

INFORME DE BÚSQUEDA INTERNACIONAL

Información relativa a miembros de familias de patentes

Solicitud internacional nº

PCT/ ES 00/00058

Documento de patente citado en el informe de búsqueda	Fecha de publicación	Miembro(s) de la familia de patentes	Fecha de publicación
WO 9734620 A -----	25.09.1997 -----	AU 2334897 A -----	10.10.1997 -----